LC/MS/MS による魚中のマラカイトグリーンとロイコマラカイトグリーンの定量

アプリケーション

食品安全性

著者

Feng Liang, Peibin Hu, and Ping Li
Agilent Technologies
Beijing, China

要約

このアプリケーションノートでは、魚中のマラカイトグリーンおよびロイコマラカイトグリーンの残留レベルを、新型 6410 LC/MS 三連四重極システムを使用して迅速かつ正確に求める分析法について紹介します。正モードのエレクトロスプレーイオン化(ESI+)とマルチプルリアクションモニタリング(MRM)を使用することで、従来の時間のかかる PbO_2 の酸化工程を行うことなく、定性と定量を行うことが可能でした。LC/MS/MS 法の LOQ は 0.01µg/Kg で、これは日本と EU で設定された 2µg/Kg の輸入条件を容易に満たしています。

はじめに

マラカイトグリーン(MG)は金属のように見える結晶です。水に容易に溶けて、青緑の溶液になります。主に染料として使用されている有毒化学物質ですが、魚および魚卵の寄生虫、真菌感染症、細菌感染の治療に非常に効果的であることが分かってきました。[1] 摂取時に、MG はロイコマラカイトグリーン(LMG)に変化するため急速に減少し、微量の MG が残った状態で魚の脂肪組織に蓄積されます。

MG は、汚染された魚を食べた人に重篤な健康上のリスクを引き起こす可能性があります。たとえば、肝腫瘍の形成の原因となることから、発がん性が疑われています。米国、日本、中国、EU、および他の多数の国では、養殖で MG を使用することを禁じています。MG は、低コストで抗カビ効果があるため、欧州の食品と飼料のための早期警戒システム(European Rapid Alert System for Food and Feed)[2] で示されているように、今でも違法に使用されています。

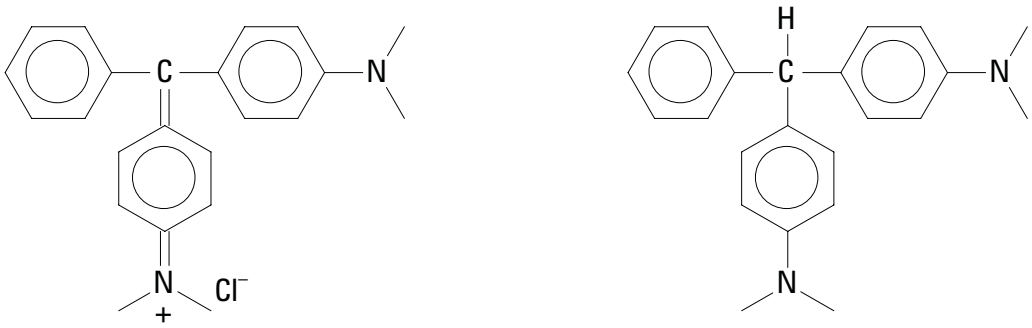
UV 検出器を備えた HPLC は MG および LMG の分析に使用されてきました。図 1 には 2 つの化合物の構造を示しています。還元によって共役結合がなくなることにより、LGM の発色団が大きく変化します。両方の和を求めるには、その分析法で PbO_2 によるポストカラムの酸化を用いて LMG を MG に変換し、さらに両成分の和を求めます。[3] ごく最近、LC/MS は、両方の化合物についてポストカラムの酸化を用いないで EU の確認基準を満たすことと、定量的な結果を求めることの両方に使用されてきました。このアプリケーションでは、MG および LMG を同時に定量するための、簡単で高感度な分析方法を示します。

実験

試薬

MG	Sigma-Aldrich、CAS 569-64-2、米国
LMG	Dr. Ehreastorfer のラボ、D-86199、99% の純度
	アウクスブルク、ドイツ
アセトニトリル	CAS 75-05-8、Burdick & Jackson、Morristown、ニュージャージー、米国
酢酸	Merck、ドイツ
酢酸アンモニウム	CAS 631-61-8、Acros 有機物、Morris Plains ニュージャージー、米国

Agilent Technologies



Malachite green　　Leucomalachite green

図 1　　マラカイトグリーンおよびロイコマラカイトグリーンの分子構造。

キャリブレーション溶液

アセトニトリルの MG および LMG の保存標準溶液は、100 µg/mL に調製し、–18 ºC で保管し、光に当たらないようにします。保存溶液を 50:50 のアセトニトリル:水で希釈し、キャリブレーション溶液–10、50、100、500、1000、5000、および 10,000 fg/µL を調製しました。

試料前処理

5g のティラピアに 1mL(0.25mg/mL)のヒドロキシルアミン、2mL の 1M のトルエンスルホン酸、2mL の 0.1M の酢酸アンモニウムの緩衝液(pH 4.5)、および 40mL のアセトニトリルを添加しました。さらにこの混合液は 2 分間、ホモジナイズしました。上澄み液を採取し、沈殿物に 20mL のアセトニトリルを加え抽出しました。この液はろ過後、上澄み液に加えました。この合わせたアセトニトリル抽出液に、35mL の水と 30mL の塩化メチレンを添加しました。溶液振とうし、塩化メチレン層を捕集しました。さらに、20mL の塩化メチレンで再度抽出を行い、この塩化メチレンを 1 番目の抽出液と混合しました。この塩化メチレンを窒素気流下で蒸発乾固し、残渣を 100 µL のアセトニトリルで再溶解しました。

装置

LC	1100 LC	
カラム	C18, 2.1 x 150mm、5µm	
カラム温度	40 ºC	
移動相	A – 10mmol/L の酢酸アンモニウム (酢酸で pH 4.5 に調整)	
	B – アセトニトリル	
カラム流量	0.3mL/min	
グラジェント	時間	%B
	0	30
	1	50
	2	95
	8	95
	8.01	30
	13	30
注入量	10µL	

MS	Agilent 6410 LC/MS 三連四重極
イオン化	ESI(+)
キャピラリ	4000V
ネブライザ圧力	35psi
乾燥ガス	11L/min
ガスの温度	350 ºC
スキマー	15V
OctDc1 (スキム 2)	45V
Oct RF	500V
Q1 分解能	ユニット
Q3 分解能	ユニット
衝突ガス	窒素

MRM パラメータは表 1 に一覧表示されています。

表1　MRM メソッドパラメータ

時間	化合物	プリカーサ	生成物	デュエル (ms)	フレグメンター (V)	衝突エネルギー(V)
0	MG	329.3	313.3	40	100	40
		329.3	208.2	40	100	40
7	LMG	331.3	316.3	40	100	30
		331.3	239.2	40	100	30

結果と議論

最も高感度な結果を得るには、特定のフラグメンター電圧の最適化が必要です。図2には、フラグメンター電圧70V、90V、および100Vにおける両方の対象化合物のEICを示しています。その結果からは、3つの異なるフラグメンター値は$[M+H]^+$イオン強度にほとんど影響を与えないということが分かります。したがって、本研究では100Vを選択しました。

さらに、MS/MSについて最適な衝突エネルギーを設定する必要があります。図3には、3つの異なる衝突電圧(a) 20V、(b) 30V、および(c) 40Vで得られたMS/MSスペクトルを示しています。これらは構造が異なるため、各化合物に対する最適な開裂に必要な電圧は異なります。MGの場合、最適な開裂は40Vで観測されました。*m/z* 313のイオンはメタンのニュートラルロスによるものです。*m/z* 208のイオンは、N,N-ジメチルアニリンのニュートラルロスによるものです。LMGの場合、最適なフ開裂は30Vで観測されました。*m/z* 316のイオンはメチル基のニュートラルロスによるものです。*m/z* 239のイオンはベンゼン基の一連のニュートラルロス、またはトルエンの再配置とニュートラルロスによるものでした。

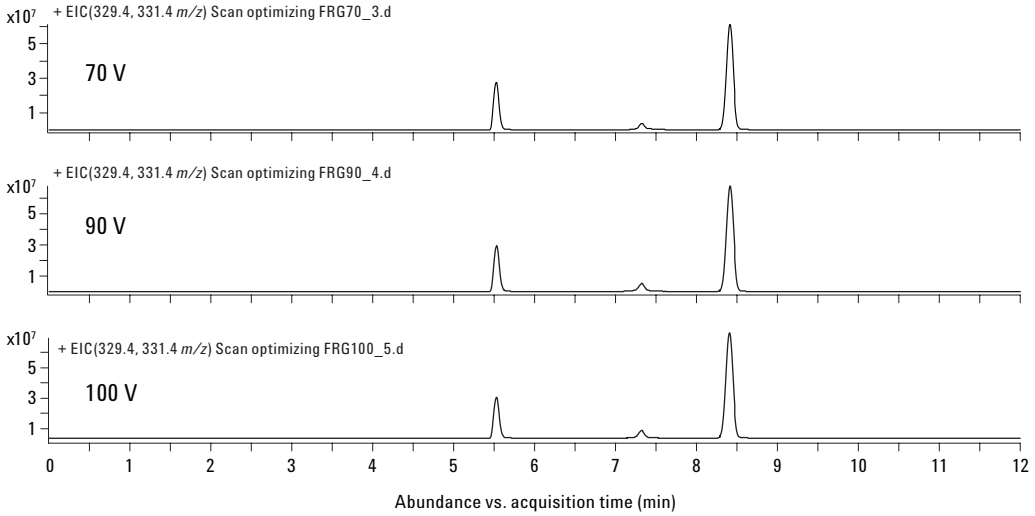


図2　70V、90V、および100Vのフラグメンターの値におけるマラカイトグリーンおよびロイコマラカイトグリーンのEIC。

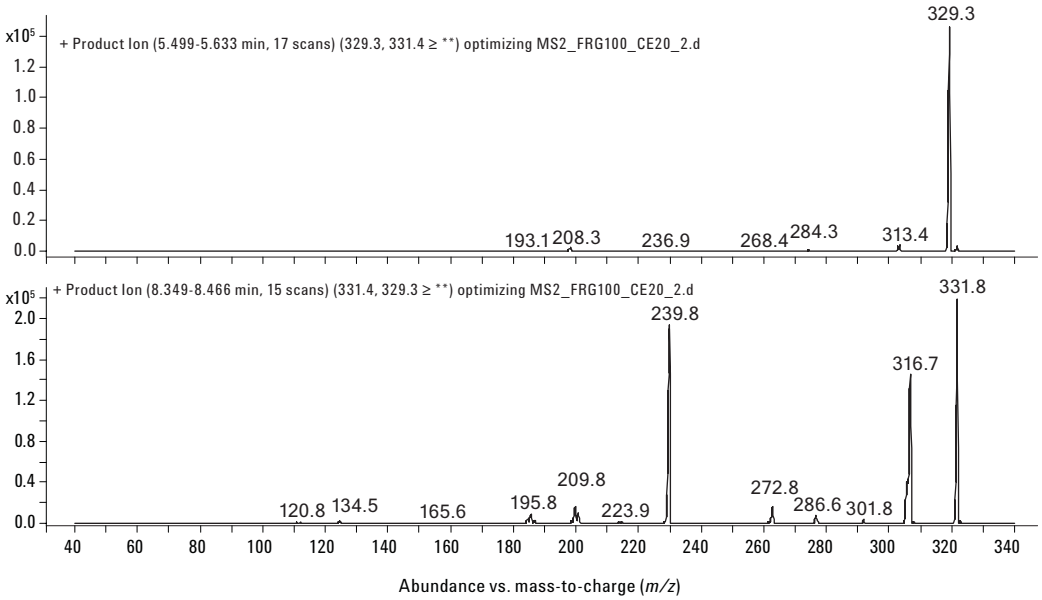


図 3a　　衝突電圧 20V における MG および LMG の MS/MS スペクトル。

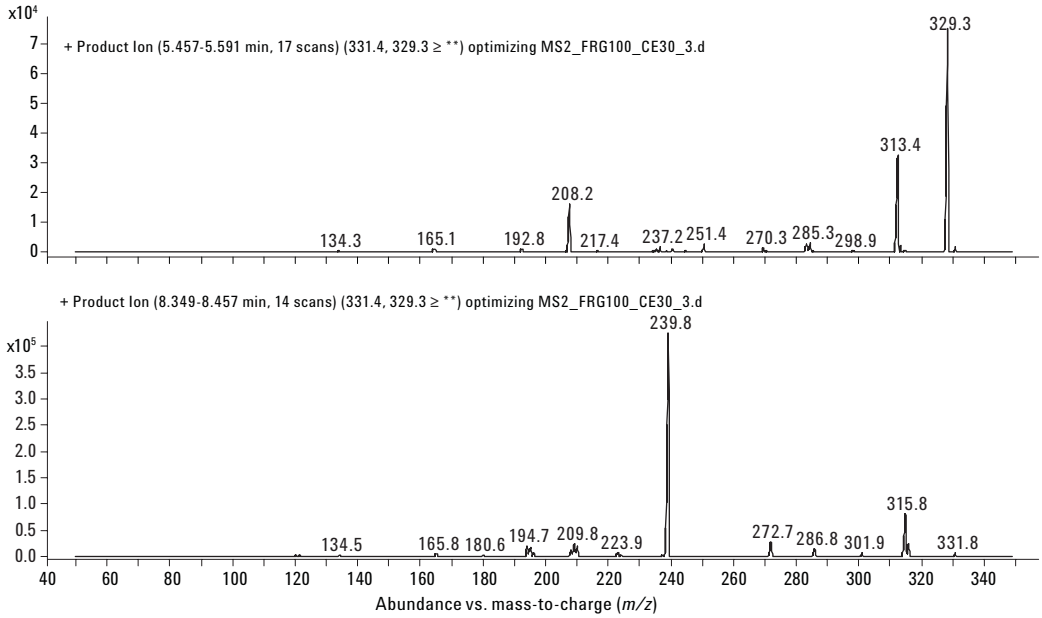


図 3b　　衝突電圧 30V における MG および LMG の MS/MS スペクトル。

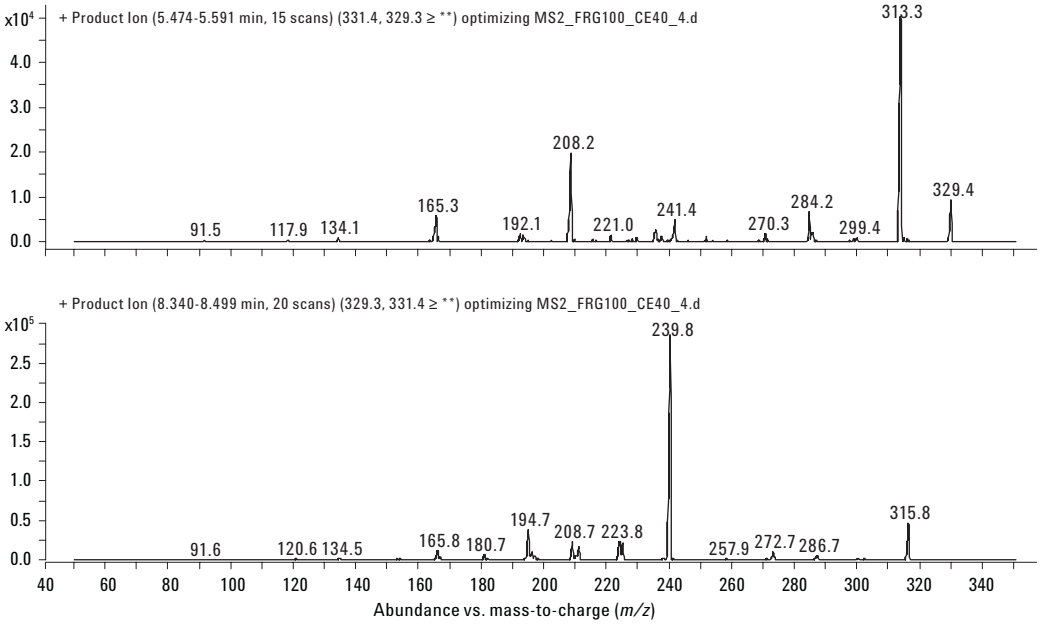


図 3c　　衝突電圧 40V における MG および LMG の MS/MS スペクトル。

図 4 には、MG (4a)と LMG (4b)の両方の検量線を示しています。キャリブレーション溶液濃度は、10 ～ 10,000 fg/µL でした。良好な直線性は両化合物共に絶対量 100 ～ 100,000fg の範囲で得られました。両化合物の相関係数は > 0.999 (原点を無視し、重み付けを行わない)でした。装置の感度を示すために、図 5 に、ブランク試料抽出液および各成分を 10ppt 添加した試料抽出液の MS/MS クロマトグラムを示しました。分析性能を実証するために、抽出前のティラピア試料には 100ppt の MG と LMG を添加しました。抽出、クリーンアップ後の MRM クロマトグラムは図 6 に示しました。MG 及び LMG の回収率は 48% および 23% でした。装置性能である再現性の検討には MG および LMG の 100 fg/µL のアセトニトリル:酢酸アンモニウム

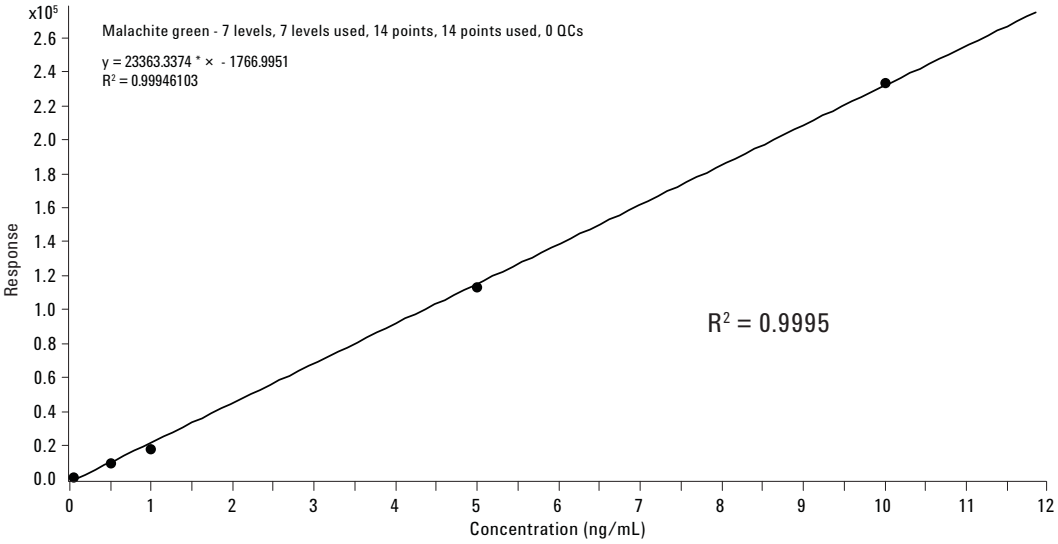


図 4a　　マラカイトグリーンの検量線、範囲は 10ppt ～ 10ppb です。

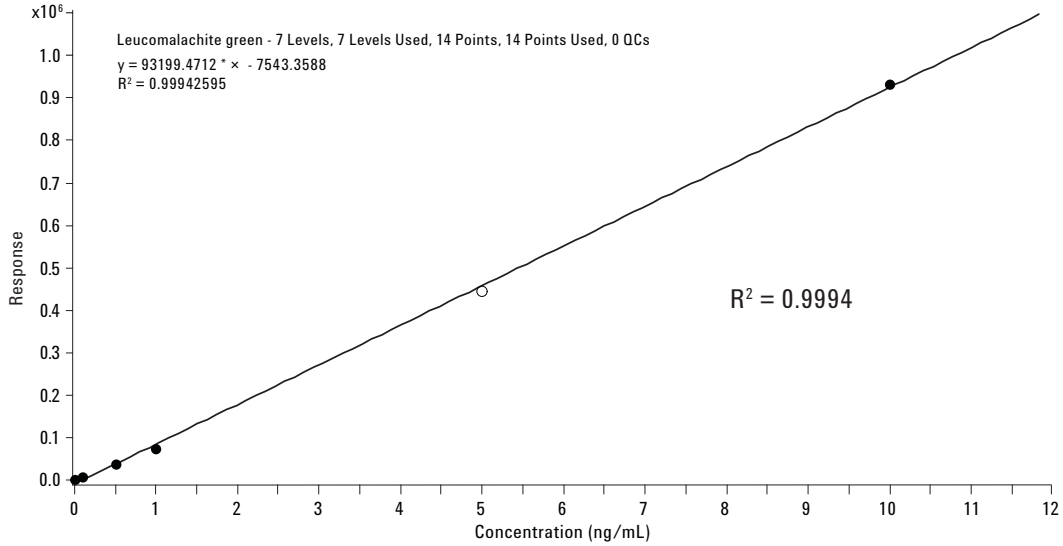

x10^6
Leucomalachite green - 7 Levels, 7 Levels Used, 14 Points, 14 Points Used, 0 QCs
y = 93199.4712 * x - 7543.3588
R² = 0.99942595
Response
R² = 0.9994
Concentration (ng/mL)

図 4b　　ロイコマラカイトグリーンマラカイトグリーンの検量線、範囲は 10ppt ～ 10ppb です。

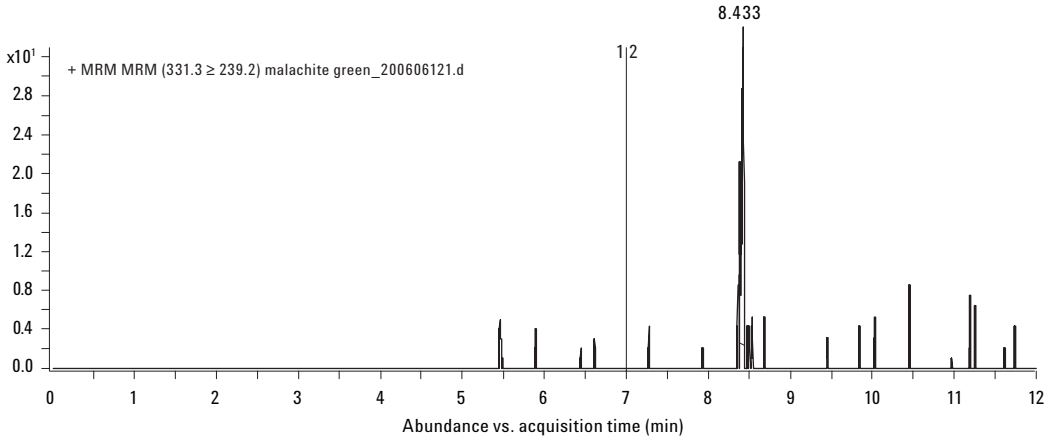
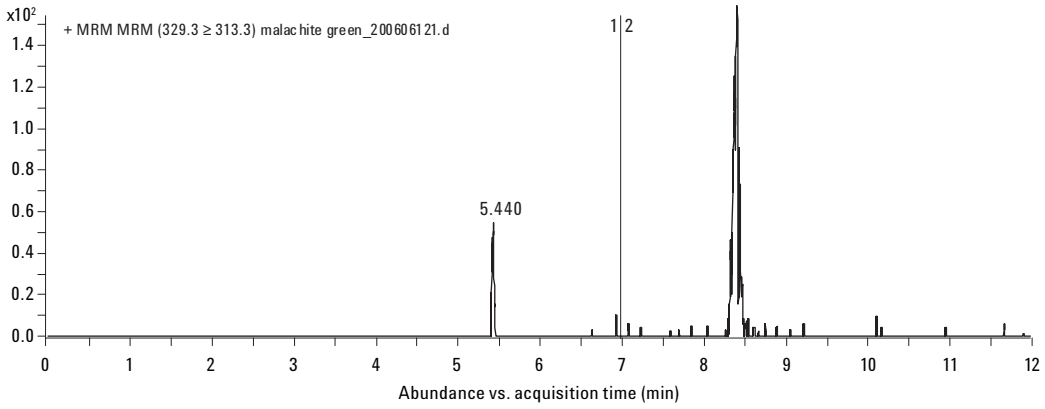


図 5a　　ブランクのサンプルの MG および LMG MRM。



ppt spiked sample.

図 5b　　10-ppt を添加したサンプルの MG および LMG MRM。

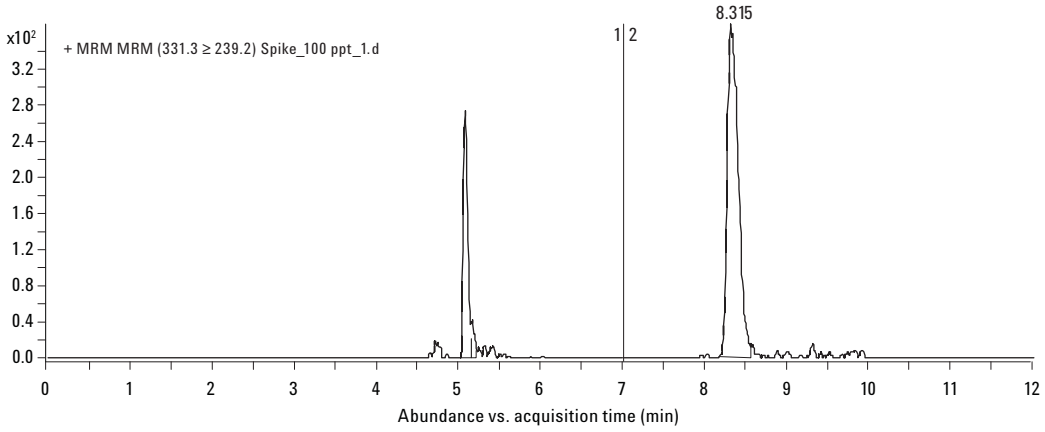


図 6　　100-ppt の MG と LMG を添加したティラピア抽出液の MRM 結果。

(50:50)混合液を用いました、。MG の場合、8 回繰り返し注入の RSD は 3.52% (S/N 比 > 20)でした。LMG の場合、8 回繰り返し注入の RSD は 2.25% (S/N 比 40)でした。

結論

このアプリケーションノートでは、魚の体内のマラカイトグリーンおよびロイコマラカイトグリーンの残留レベルを迅速かつ正確に求める分析法について紹介しました。正モードのエレクトロスプレーイオン化(ESI+)とマリチプルリアクスオンモニタリング(MRM)の手法を使用した LC/MS/MS 分析法は 10ppt の検出限界を示し、これは日本と EU で設定された 2µg/Kg の輸入要件を満たしています。

参考文献

1. S. Srivastava, R. Sinha, and D. Roy、マラカイトグリーンの毒性効果。*Aquatic Toxicology* 2004 年、66, (3), 319–329.
2. 欧州の食品と飼料のための早期警戒システム(RASFF)年報 2005、2005, 29.
3. C. A. Hajee and N. Haagsma、ポストカラム酸化を用いたウナギのプラズマにおけるマラカイトグリーンおよびそのロイコマラカイトグリーンの同時定量。*Journal of Chromatography B Biomed Appl.* 1995, 669, (2), 219–227.
4. M. D. Hernando, M. Mezcua, J. M. Suarez-Barcena, and A. R. Fernandez-Alba、鮭体内の化学薬品残留物の同時定量向けの飛行時間型の質量分析器を備えた液体クロマトグラフィ。*Analytica Chimica Acta* 2006, 562, (2), 176–184.
5. K.-C. Lee, J.-L. Wu, and Z. Cai、液体クロマトグラフィイオントラップ質量分析による食用の金魚の筋肉中のマラカイトグリーンおよびロイコマラカイトグリーンの定量。*Journal of Chromatography B* 2006, In Press, Corrected Proof.
6. 2004/25/EC:動物に由来する食物内の特定残留物について必要とされる最小の性能限界(MRPLs)の設定に関して 2002/657/EC の決定を改定する 2003 年 12 月 22 日の委員会決定(EEA 関連のテキスト) (文書番号 C [2003] 4961 で通知されました)。 2003.

謝辞

標準溶液およびサンプル抽出液を提供してくださった Dr. Yanqin Liu に感謝いたします。

詳細情報

製品とサービスに関する詳細情報については、弊社のホームページ www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

Agilent は、Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。
また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。
著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan
October 25, 2006
5989-5807JAJP

Agilent Technologies